

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07D 413/04, 473/34	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/07907 (43) Date de publication internationale: 23 mars 1995 (23.03.95)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01070</p> <p>(22) Date de dépôt international: 12 septembre 1994 (12.09.94)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 93/10864 13 septembre 1993 (13.09.93) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). CENTRE NATIONAL D'ETUDES SPATIALES [FR/FR]; 2, place Maurice-Quentin, F-75001 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MOLKO, Didier [FR/FR]; Les Noyers A1-I, 11, avenue de la Gare, F-38210 Tullins (FR). CADET, Jean [FR/FR]; 1, rue Jean-Moulin, F-73160 Cognin (FR). CIMAZ, Isabelle [FR/FR]; 161, cours Berriat, F-38000 Grenoble (FR).</p> <p>(74) Mandataire: BREVATOME; 25, rue de Ponthieu, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: NUCLEOSIDE DERIVATIVES, METHODS FOR THE MANUFACTURE THEREOF AND SPECIFIC POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTIBODIES OF SAID DERIVATIVES</p> <p>(54) Titre: DERIVES DE NUCLEOSIDES, PROCEDES DE FABRICATION DE CES DERIVES DE NUCLEOSIDES ET ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE CES DERIVES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Nucleoside derivatives, methods for the manufacture thereof and specific polyclonal and monoclonal antibodies of said derivatives. The derivatives have formula (I) wherein R¹ is H or a linear mono-, di- or tri-phosphoric acid, R² is a hydroxyl group, an alkyl group, an aryl group, a protein comprising a free amine site, a polystyrene aminoalkyl or silica grafted with an alkylamine chain, and R³ is a substituted base selected from uracil, thymine, cytosine, guanine or adenine.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des dérivés de nucléosides, des procédés de fabrication de ces dérivés de nucléosides, ainsi que des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques des dérivés précités. Ces dérivés répondent à la formule chimique (I) dans laquelle R¹ représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R² représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle, un groupe aryle, une protéine comprenant un site aminé libre, un aminoalkyle polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine et R³ représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.</p> <div data-bbox="974 1302 1510 1596" data-label="Chemical-Block"> <p style="text-align: right;">(I)</p> </div>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

DERIVES DE NUCLEOSIDES, PROCEDES DE FABRICATION DE CES
DERIVES DE NUCLEOSIDES ET ANTICORPS POLYCLONAUX ET
MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE CES DERIVES

5 L'invention concerne des dérivés de nucléosides, des procédés de fabrication de ces dérivés de nucléosides, ainsi que des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques des dérivés précités.

La macro molécule d'A.D.N. (acide désoxyribonu-
10 cléique) est le constituant des chromosomes et les différents segments de cette molécule forment les gènes, supports des caractères héréditaires. L'A.D.N. se présente sous la forme d'une double hélice spiralée, formée alternativement de sucre (désoxyribose) et de
15 , phosphate, les spirales des deux chaînes étant réunies localement par des groupements de bases nucléiques azotées, de type purinique ou pyrimidinique. Les nucléotides constituant l'A.D.N. sont les esters phosphoriques des nucléosides.

20 Les bases nucléiques de l'A.D.N. d'un individu (ou d'un animal ou d'un végétal) peuvent être modifiées et endommagées lorsque cet individu est exposé à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (vols intercontinentaux), à des photosensibilisateurs,
25 au contact avec l'amiante ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un traitement de radiothérapie. Ces modifications des bases nucléiques de l'A.D.N. pouvant entraîner une modification importante du patrimoine génétique de
30 l'individu concerné, il est particulièrement important de détecter si de telles modifications se sont produites et de préciser la nature des modifications survenues.

Il serait donc intéressant de mettre au point une
35 technique de dosage susceptible d'être utilisée chez

les patients suspectés d'avoir subi des modifications de leur A.D.N.

5 Parmi les diverses techniques de dosage permettant de déterminer la présence d'A.D.N. modifié dans un échantillon, les immunodosages consistent à faire réagir un anticorps spécifique d'une modification particulière de l'A.D.N. avec un échantillon contenant de l'A.D.N. isolé ou hydrolysé. Ces anticorps sont généralement produits par clonage.

10 La fabrication d'anticorps polyclonaux (ou monoclonaux) nécessite tout d'abord la fabrication d'antigènes spécifiques, c'est-à-dire de nucléosides ou de nucléotides dont les bases nucléiques ont subi les modifications que l'on cherche à détecter, ces
15 nucléosides ou nucléotides étant liés à une grosse molécule, par exemple une protéine. Un nucléoside ou un nucléotide seul trop petit n'est pas perçu par le système immunitaire. Ensuite, les anticorps polyclonaux sont produits par un mammifère qui a reçu une injection
20 de l'antigène précité, cet antigène comprenant une protéine étrangère au mammifère considéré, liée à un haptène (molécule de petite taille contre laquelle on souhaite obtenir les anticorps spécifiques).

On connaît déjà d'après l'art antérieur des techniques de dosages immunologiques des acides nucléiques.
25 L'article de Christopher P. WILD : "Antibodies to D.N.A. alkylation adducts as analytical tools in chemical carcinogenesis", Mut. Res., (1990), 233, 219-233, est justement consacré aux anticorps spécifiques de
30 nucléotides dont les bases nucléiques ont subi des modifications par alkylation. Cet auteur insiste sur le rôle des anticorps dans les dosages immunologiques utilisés dans les études épidémiologiques des cancers humains et de la cancérogénèse chimique, due notamment
35 à des agents alkylants.

L'article de B. D. Stollar : "Immunochemical Analyses of nucleic acids", Progress in Nucleic Acid, Research and Molecular Biology, (1992), 42, 39-75, concerne également des anticorps spécifiques des acides
5 nucléiques.

Par ailleurs, certains défauts oxydatifs de l'A.D.N. ont fait l'objet de plusieurs publications.

Ainsi, l'article de G.J. West et al. : "Radioimmunoassay of 8-hydroxyadenine", Int. J. Rad.
10 Biol., (1982), 42, 481-490, décrit des dosages radio-immunologiques de la 8-hydroxyadénine. Cette modification de l'A.D.N. peut survenir après une irradiation aux rayons .

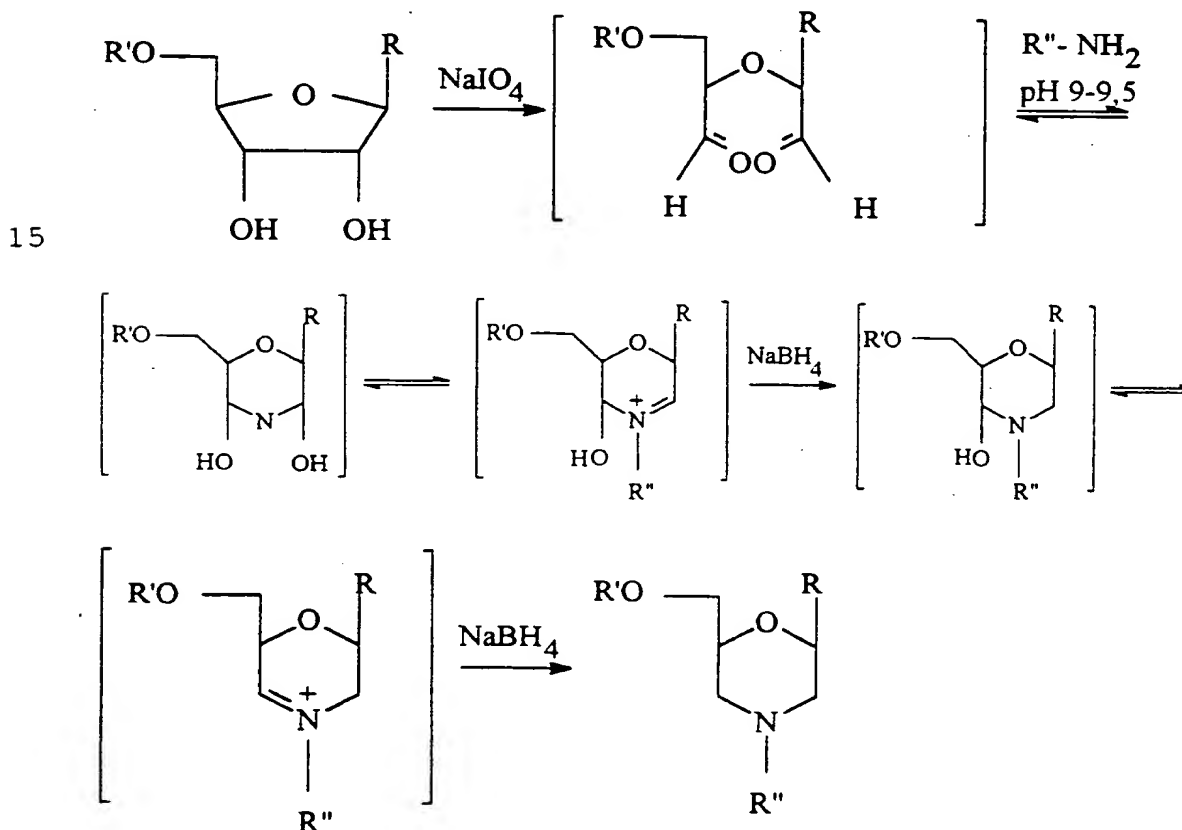
L'article de P. Degan et al., "Quantitation of
15 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies", Carcinogenesis, (1991), 12, 865-871, décrit des anticorps polyclonaux spécifiques de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine et de la 8-hydroguanine. Ces anticorps polyclonaux peuvent être utilisés dans
20 des dosages immunologiques afin d'isoler rapidement les deux types précités de guanosine modifiée, dans un échantillon d'urine par exemple.

L'article de H.L. Lewis et al., "Serologic Assay of DNA Base Damage", Rad. Res. (1978), 75, 305-316,
25 concerne la préparation d'anticorps polyclonaux et le dosage de la 5-hydroxyméthyl-désoxyuridine, obtenue après irradiation ionisante de la thymidine.

Enfin, l'article de S.A. Leadon et P.C. Hanawalt, "Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol",
30 Mut. Res., (1983), 112, 191-200, concerne des anticorps monoclonaux de la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (thymine glycol) obtenue après que de l'A.D.N. ait été soumis à des radiations ionisantes ou proches de l'ultraviolet. Ces anticorps monoclonaux ont été obtenus en
35 faisant fusionner des cellules de myélome de souris

avec des cellules de rate provenant de la lignée de souris BALB-c, ces souris ayant été immunisées avec une poly(d-thymine) oxydée par OsO_4 puis complexée avec de la sérumalbumine de bovin méthylée. Les tests sont effectués par des méthodes ELISA.

L'article de B.F. Erlanger et S.M. Beiser, "Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA", Proc. N.A.S. USA, (1964), 52, 68-74, décrit un protocole de couplage d'un acide nucléique avec une protéine porteuse, permettant de former un antigène, susceptible d'être utilisé dans un protocole d'immunisation de lapins. Ce protocole de couplage est représenté ci-dessous.



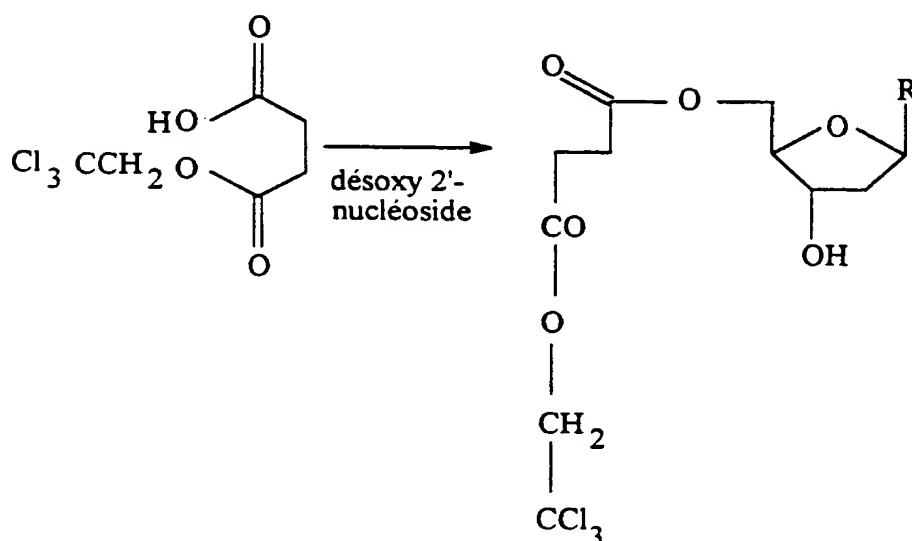
R représentant une base purinique ou pyrimidinique, R' représentant H ou $-PO-(OH)_2$ et R'' représentant le reste d'une protéine.

5 Ce procédé consiste à agir sur l'ose d'un ribonucléoside par action du periodate de sodium. Le cycle de l'ose est ouvert entre les carbones 2' et 3' et il se forme un dialdéhyde. Ce dialdéhyde est alors couplé à une protéine, à un pH voisin de 9 à 9,5. Le $NaBH_4$ intervient pour réduire la base de Schiff obtenue comme
10 produit intermédiaire.

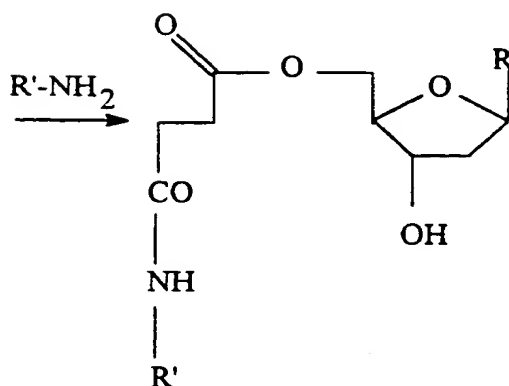
Toutefois, le procédé divulgué dans cet article est limité à des bases nucléiques n'ayant pas subi de modifications. En effet, avec certaines bases fragiles sensibles à l'oxydation et/ou à la réduction, il serait
15 impossible de modifier au préalable ces bases de nucléosides, puis de faire subir à ces nucléosides modifiés, une étape d'oxydation par le periodate de sodium, suivie d'une étape de réduction par le borohydrure de sodium. Après un tel traitement
20 chimique, la plupart des défauts pour lesquels on souhaite étudier les A.D.N. modifiés, seraient altérés.

En outre, l'enchaînement des réactions décrit dans ce procédé est effectué sans isoler les produits intermédiaires. En conséquence, un certain nombre de produits parasites sont susceptibles d'apparaître au cours
25 du procédé et d'être présents dans la protéine conjuguée finale. Chaque produit parasite peut potentiellement induire une réaction immunitaire qui lui est propre. Dans ce cas, le mélange d'anticorps obtenu pourrait n'avoir qu'une faible sélectivité. Ceci est le
30 cas dans l'article de H.L. Lewis et al. précédemment cité, où la molécule cible était la 5-hydroxyméthyluracile et où l'anti-sérum obtenu reconnaissait également la thymine qui est une base
35 naturelle de l'A.D.N.

On connaît également d'après l'article de T. Okabayashi et al., "A radioimmunoassay for 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine", Cancer Res., (1977), 17, 619-624, un procédé consistant à faire réagir un dérivé de l'acide succinique avec un désoxynucléoside dont la base a été modifiée, puis à créer une fonction amide avec l'amine libre d'une protéine. Ce procédé est illustré ci-dessous.



10

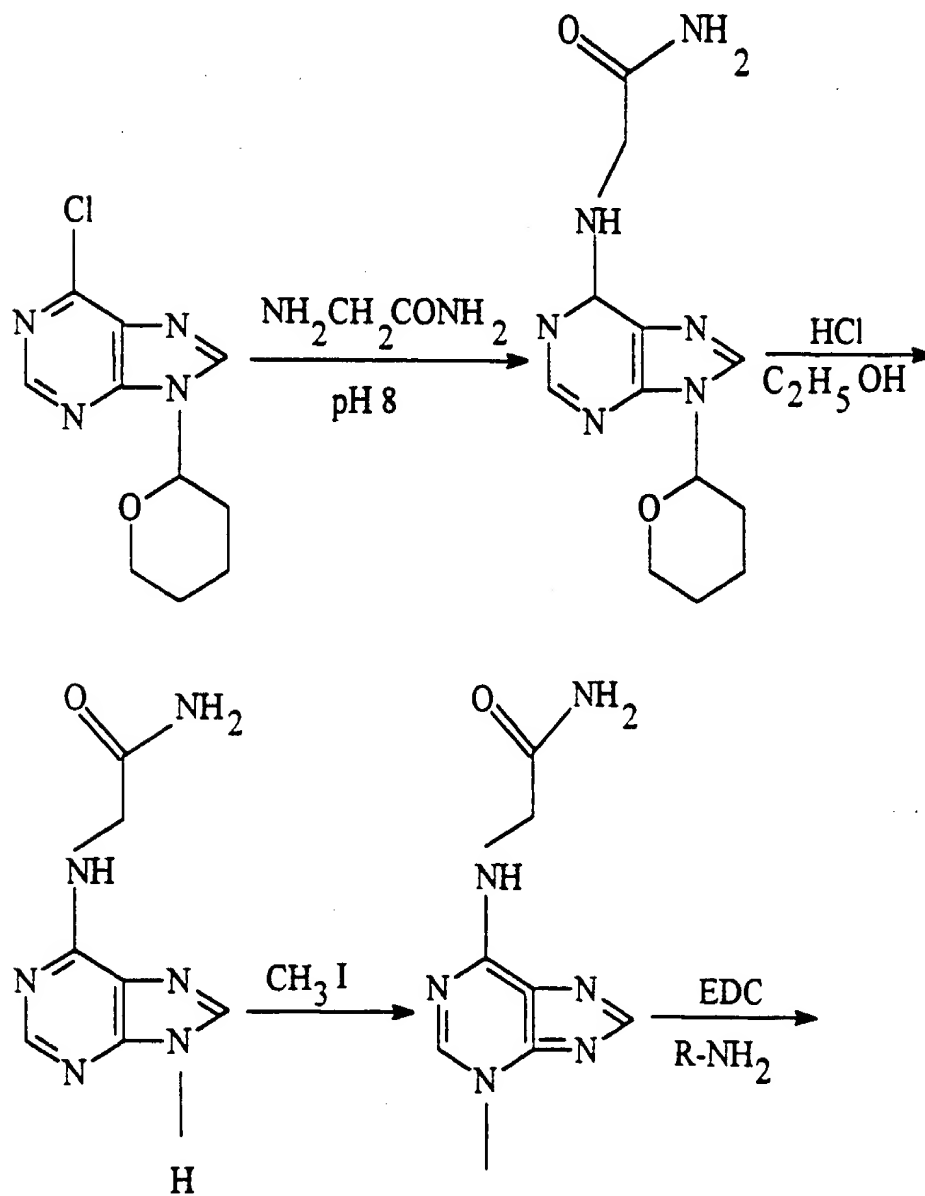


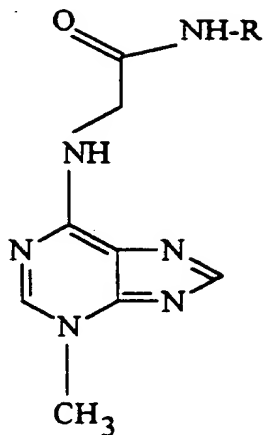
R représentant une base purinique ou pyrimidinique et
15 R' le reste d'une protéine.

Le principal défaut de ce procédé réside dans le manque de stabilité de la fonction ester utilisée pour conjuguer le nucléoside à la protéine.

Enfin, on connaît également d'après un article de
5 M.D. Friesen et al., "Isolation of Urinary 3-methyladenine", Chem. Res. Toxicol., (1991), 4, 102-106, l'une des méthodes les plus employées pour coupler une base nucléique alkylée à une protéine. Cette méthode est illustrée ci-dessous.

10





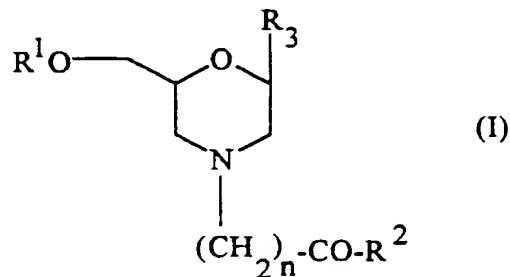
dans laquelle R est une protéine et EDC représente le
chlorhydrate de 1-[3-diméthylamino)propyl]-3-
5 éthyldicarbodiimide.

Cette méthode diffère des deux précédentes en ce
que le produit de départ n'est ni un ribo ni un désoxy-
ribonucléoside modifié, mais un dérivé alkylé de la
base. Elle permet de former des anticorps d'une excel-
10 lente qualité car l'haptène utilisé est purifié juste
avant sa conjugaison à la protéine. Toutefois, cette
technique est plus difficile à mettre en oeuvre que les
deux procédés exposés précédemment.

L'invention a consisté à mettre au point des anti-
15 gènes et des procédés de fabrication de ces antigènes
évitant les inconvénients précédemment cités.

A cet effet, l'invention concerne des dérivés de
nucléosides caractérisés en ce qu'ils répondent à la
formule chimique suivante :

20



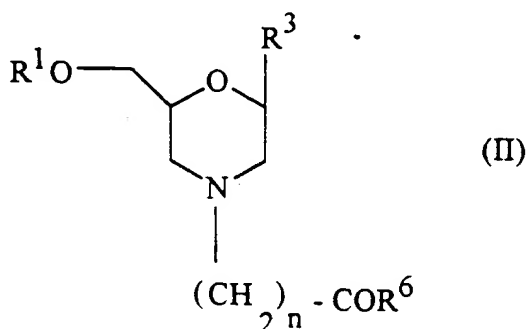
dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R^2 représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle, un groupe aryle, une protéine comprenant un site aminé, un aminoalkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine et R^3 représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

On utilise l'expression "dérivés de nucléosides" puisqu'ils sont formés à partir de nucléosides, toutefois dans ces dérivés l'ose a disparu et est remplacé par la morpholine.

Lorsque R^2 représente une protéine, l'antigène obtenu peut servir de base à la fabrication d'anticorps.

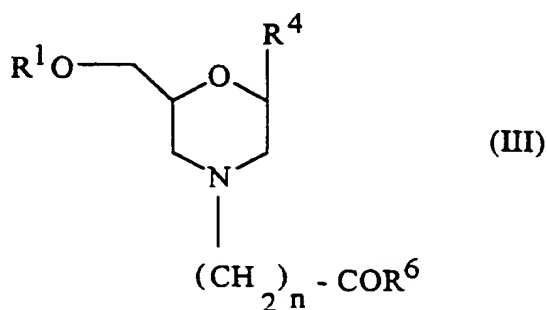
Lorsque R^2 est un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée, par exemple, le produit obtenu est un support solide auquel est lié l'haptène. De tels supports peuvent être utilisés dans des dosages de type ELISA (marque déposée).

L'invention concerne également un procédé de fabrication de dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R^6 représente un groupe

hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R^3 représente un base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, consistant à faire réagir un agent substituant avec un
 5 dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :



10 dans laquelle R^1 et R^6 ont la même signification que précédemment et R^4 représente une base nucléique choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

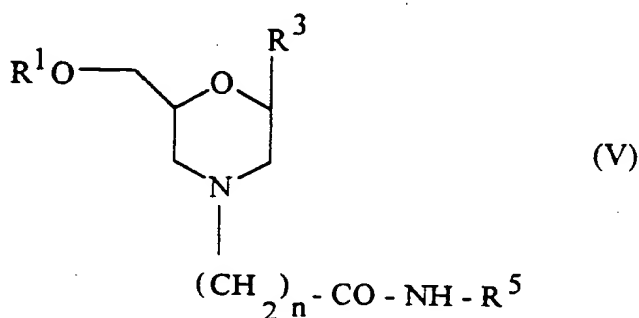
Contrairement à certains procédés connus de l'art
 15 antérieur, le procédé selon l'invention ne fait pas intervenir de liaison ester fragile entre le nucléoside modifié et la protéine. Les conjugués obtenus sont donc beaucoup plus stables et peuvent être stockés en solution sans être dégradés, pendant une période plus longue.
 20

Le produit de départ (III) présente une morpholine à la place du cycle désoxyribosidique. Ce produit est stable. Il est en outre soigneusement purifié avant d'être utilisé dans le procédé. Ceci évite la présence
 25 de "parasites" ou contaminants dans l'haptène fabriqué.

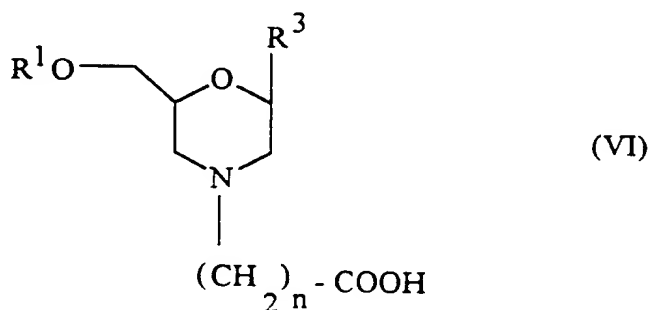
Enfin, le produit de départ (III) a déjà subi la transformation du cycle osidique en cycle morpholinique avant que la base nucléique ne soit modifiée au cours du procédé selon l'invention. Cela permet d'envisager

la préparation d'antigènes dans lesquels les bases nucléiques sont oxydées ou réduites, ce qui est beaucoup plus difficile à obtenir si la synthèse du cycle morpholinique intervient après la modification de la

L'invention concerne également un autre procédé de fabrication de dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^3 représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine et R^5 représente le reste d'une protéine, un alkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkyle, ce procédé consistant à faire réagir un composé du type NH_2-R^5 , dans lequel R^5 a la même signification que précédemment avec un dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :

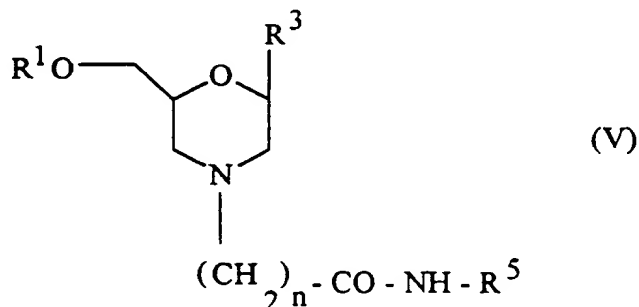


dans laquelle R^1 et R^3 ont la même signification que précédemment.

Lorsque NH_2-R^5 est une protéine, le produit (V) obtenu est un antigène. Lorsque NH_2-R^5 est un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine, le produit (V) obtenu est un support solide. Ainsi, dans un procédé de dosage ELISA, les parois des tubes à essais ou les puits des plaques pourraient être recouverts de silice greffée, ce qui pourrait permettre de lier l'haptène au support de manière covalente.

Par ailleurs, la Société Pharmacia commercialise un appareil destiné à étudier de manière dynamique les interactions entre molécules biologiques (connu sous la marque déposée BiaCore). Le principe consiste à fixer une molécule sur un support solide et à faire circuler une solution contenant l'autre protagoniste. Le support solide obtenu selon l'invention peut être utilisé dans ce type d'appareil.

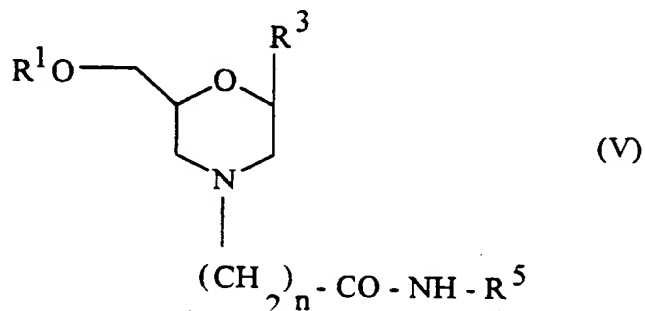
Par ailleurs, l'invention concerne également des anticorps polyclonaux anti-dérivé de nucléosides, obtenus par immunisation d'un mammifère appropriée avec l'antigène répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^3 représente une base nu-

cléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R⁵ représente une protéine ne provenant pas dudit mammifère.

Enfin, l'invention concerne des anticorps monoclonaux anti-dérivés de nucléosides obtenus en faisant fusionner des cellules de myélome d'un mammifère avec des cellules spléniques de souris immunisées par un antigène répondant à la formule chimique suivante :

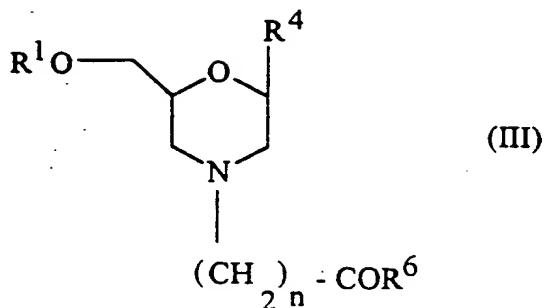


dans laquelle R¹ représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R³ représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R⁵ représente une protéine ne provenant pas de la souris.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante d'un mode de réalisation de l'invention donné à titre d'exemple illustratif et non limitatif.

Un premier procédé de préparation des dérivés de nucléosides selon l'invention consiste à utiliser un nucléotide ou un nucléoside déjà modifié par formation d'une morpholine, de façon à pouvoir se lier ultérieurement par exemple avec un groupe aminé appartenant à une protéine.

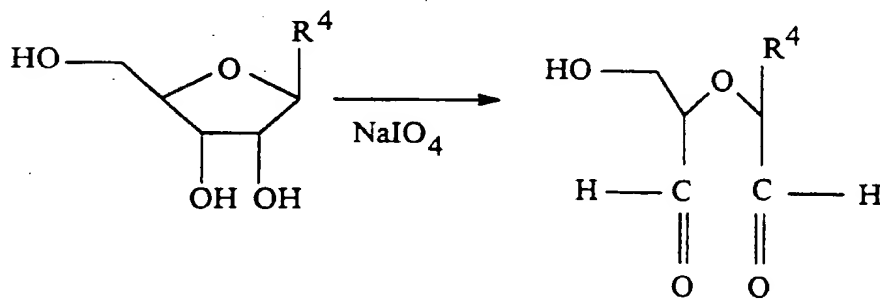
Le produit de départ (III) (dénommé ci-après "morpholinonucléoside") présente la formule chimique suivante :

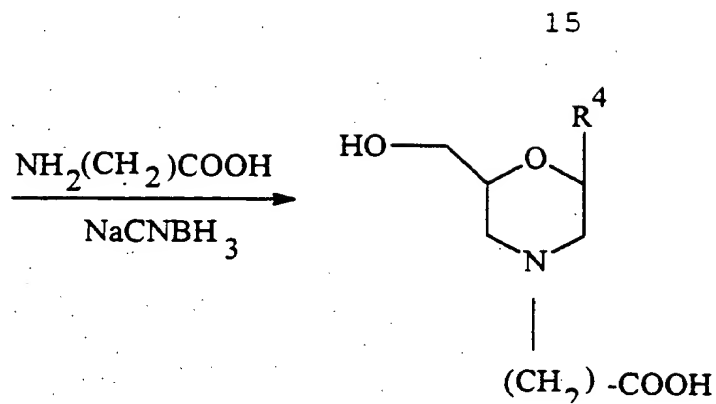


5

dans laquelle R^1 représente H ou acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R^6 représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R^4 représente une base nucléique choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

Ce produit (III) peut être obtenu par exemple selon un procédé décrit dans l'article de R. Rayford et al., "Reductive alkylation with oxydized nucleotides", J. Biol. Chem., (1985), 260, 15708-15713 et illustré ci-dessous :





R^4 ayant la même signification que précédemment.

Ce procédé consiste à faire réagir un nucléoside avec du periodate de sodium, afin d'ouvrir la liaison entre le carbone 2' et le carbone 3'. On obtient ainsi un dialdéhyde que l'on fait réagir avec du glycolle pour former une double base de Schiff. On réduit cette double base par du NaCNBH_3 afin de conduire à un "morpholinonucléoside". Le nucléoside utilisé dans cet article était l'adénosine. Toutefois, de façon similaire, ce traitement peut être effectué avec d'autres bases puriniques ou pyrimidiniques. De même, le nucléoside peut être remplacé par un nucléotide dans lequel l'acide phosphorique est en position 5.

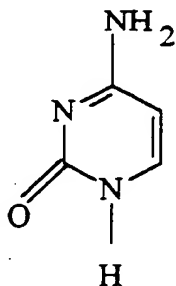
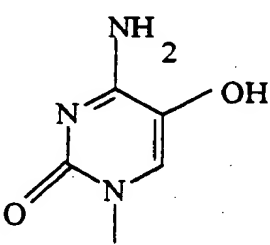
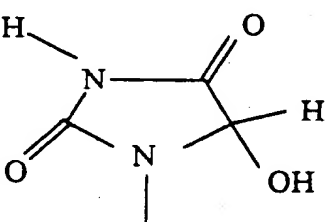
Lorsque R^6 est un groupe alkyle ou un groupe aryle, le produit III est un ester. Il peut être obtenu par le procédé qui vient d'être décrit en remplaçant le glycolle par un glycinate, tel qu'un glycinate d'éthyle ou de t-butyle, par exemple. De plus, ces dérivés peuvent être transformés en esters actifs pour être condensé sur une fonction amine.

Le produit de départ (III) du procédé selon l'invention peut également être obtenu par n'importe quel autre procédé.

Les agents substituants permettant d'effectuer les substitutions sur les bases puriniques ou pyrimidiniques, sont généralement des agents qui entraînent des modifications oxydatives de ces bases.

Ces agents sont des agents chimiques ou un traitement physique. Les agents chimiques sont choisis par exemple parmi l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, le brome combiné à la collidine, le brome et l'oxyde d'argent, 5 le permanganate de potassium, le tétraoxyde d'osmium, le méthanal ou AlLiH_4 . Le même résultat pourrait être obtenu par action de rayonnements ionisants en présence ou en l'absence d'oxygène, par photochimie (U.V. puis photosensibilisateur), par hydrogénation catalytique ou 10 par traitement par le brome et l'eau puis hydrogénolyse. On donnera ci-après un tableau I récapitulatif des agents substituants et des substitutions qu'ils entraînent sur les différentes bases puriniques ou pyrimidiniques.

Tableau I

Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées (R ³)
cytosine 	brome puis collidine ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur	 (5-hydroxycytosin)-1yl
	ozone ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 (5-hydroxyhydantoïne)-1yl
	rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	-NH-CO-NH-CO-NH ₂

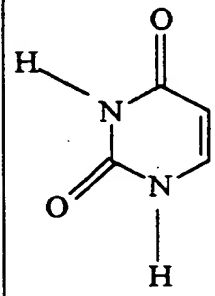
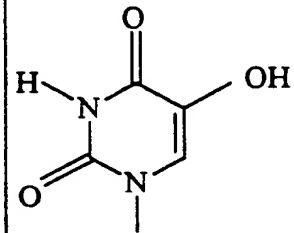
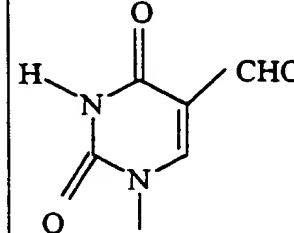
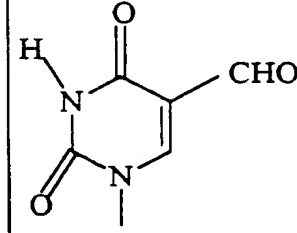
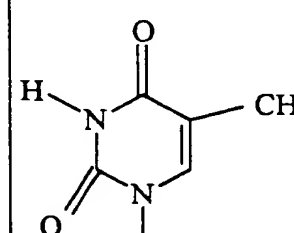
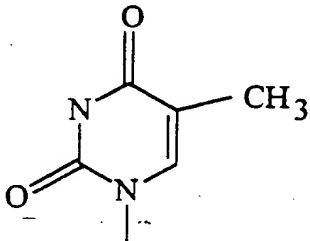
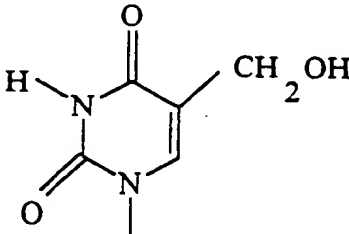
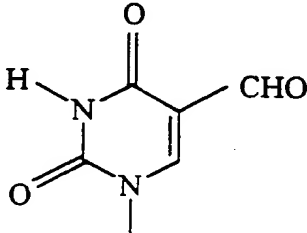
<p>uracile</p> 	<p>brome puis collidine ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)</p>	 <p>(5-hydroxyuracil)-1yl</p>
	<p>H₂CO</p>	 <p>(5-formyluracil)-1yl</p>
	<p>Al . LiH₄</p>	 <p>(5-hydroxyméthyluracil)-1yl</p>

Tableau I (suite)

Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées (R ³)
thymine (ou 5-méthyluracile) 	rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 5-hydroxyméthyl- uracil-1yl ou  5-(formyl-uracil)-1yl
	ozone ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	-NH-CHO

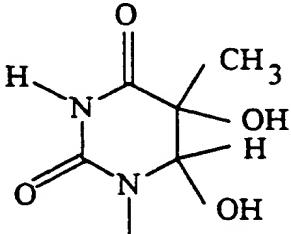
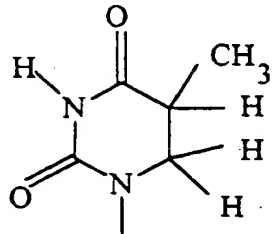
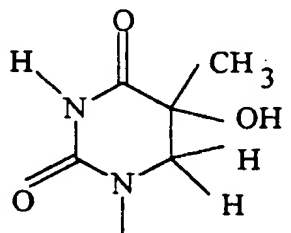
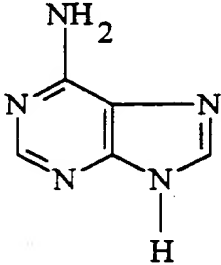
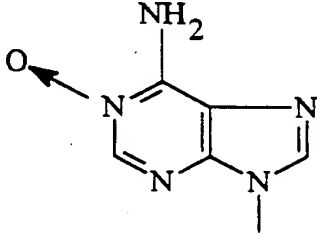
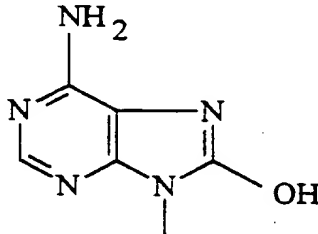
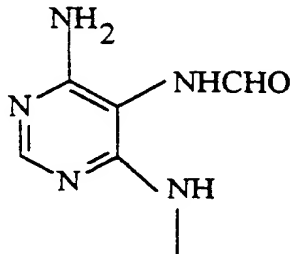
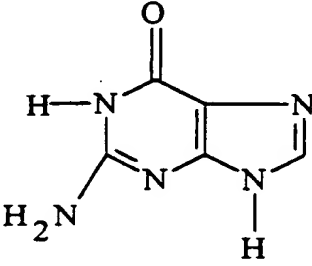
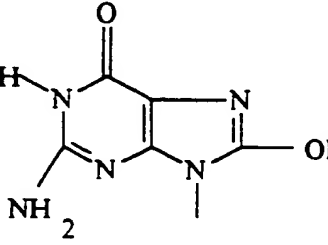
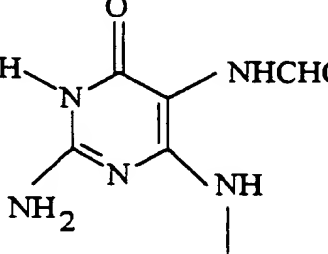
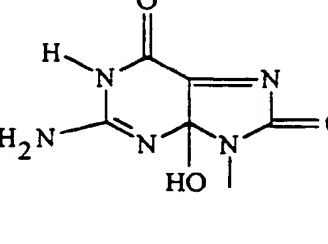
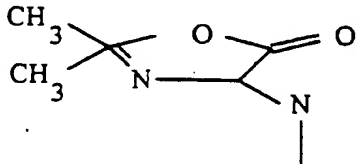
<p> KMnO_4 ou OsO_4 ou Br_2 puis Ag_2O ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur) </p>	 <p>5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl</p>
<p> hydrogène (par hydrogénation catalytique en présence de Palladium ou de rhodium) ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur) ou rayonnement ionisant en l'absence d'oxygène </p>	 <p>(5,6-dihydrothymine)-1yl</p> <p>ou</p>  <p>(5,6-dihydro-5-hydroxythymine)-1yl</p>

Tableau I (suite)

Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées
adénine 	H ₂ O ₂	 adénine-N1-oxyde
	Br ₂ + H ₂ O puis hydrogénolyse ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 (8-oxo-7,8- dihydroadénine)-9yl
	rayonnements ionisants sans oxygène ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 [(6-amino-5- formylamino- pyrimidin)-4yl]amino

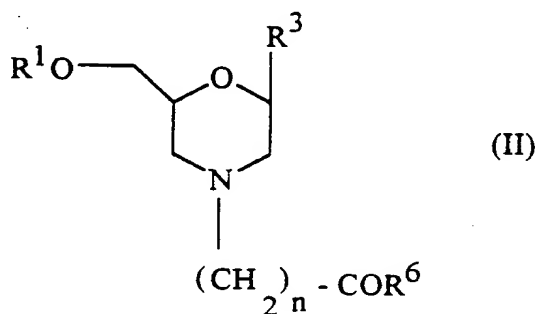
<p>guanine</p> 	<p>Br₂ puis hydrogénolyse ou rayonnements ionisants</p>	 <p>8-oxo-7,8- dihydroguanine-9yl</p>
	<p>rayonnements ionisants sans oxygène</p>	 <p>[(2-amino-6-oxo-5- formylamino- pyrimidin)-4yl]amino</p>
	<p>photochimie (U.V. + photosensibilisateur) ou oxygène singulet</p>	 <p>(4,8-dihydro-4- hydroxy-8-oxo- guanine)-9yl</p>

23

	rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + phososensibilisateur)	 [(2,2-diamino-oxazyl-4 one)-5yl]amino
--	---	--

A l'issue du procédé selon l'invention, on obtient l'haptène de formule chimique suivante :

5



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^6 représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R^3 est une base substituée choisi parmi la cytosine, l'uracile, la thymine, l'adénosine et la guanine et de préférence l'une des bases modifiées ou substituées du tableau I.

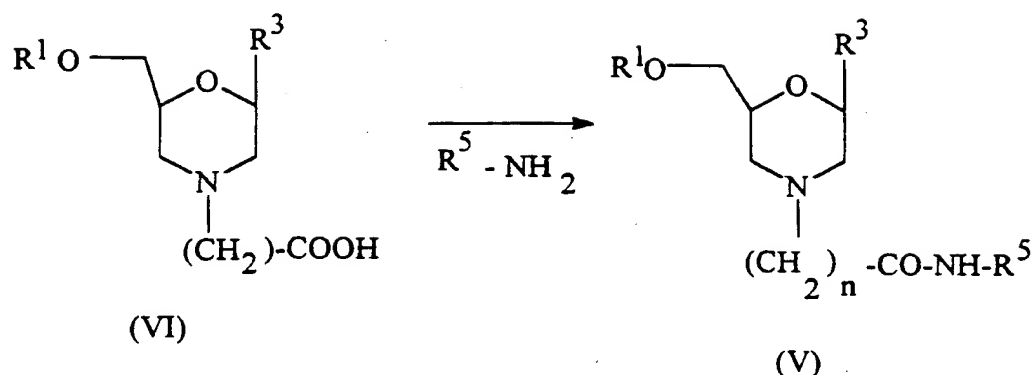
On notera que le produit II représente un certain nombre de variantes possibles du produit (I).

On donnera ci-après un exemple de préparation spécifique de l'un de ces haptènes.

Exemple 1 : synthèse de la 2-(5-hydroxycytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-(hydroxyméthyl)-morpholine

On dissout 100mg de 1-(cytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-hydroxyméthyl morpholine dans 5 ml
5 d'eau. On ajoute ensuite du brome goutte à goutte, jusqu'au maintien de la coloration jaune. Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, l'excès de brome est chassé par barbotage d'air dans la solution. On ajoute ensuite 200 µl de collidine et la solution
10 est agitée pendant 2 heures, à la température ordinaire. L'eau est évaporée sous pression réduite puis la collidine libre est éliminée par co-évaporation de 5 ml d'éthanol. Le résidu obtenu est analysé par chromatographie liquide haute pression (colonne
15 Nucleosil 10-C18, dimensions 6x300 mm, phase mobile acétate de triéthylammonium 50 mM et méthanol). L'analyse montre la présence d'un produit majoritaire (60%) différent du composé de départ. L'analyse par RMN du produit collecté montre qu'il s'agit bien du composé
20 attendu. Ce produit est caractérisé par un maximum d'absorption dans l'ultraviolet à 290,4 nm pour un coefficient d'extinction moléculaire de 5700 mol.l⁻¹.cm⁻¹.

25 Le deuxième procédé selon l'invention consiste à traiter l'haptène (VI) obtenu à l'issue du premier procédé de façon à former par exemple un antigène ou une phase solide (film, gel) dans laquelle l'haptène VI est fixé au support de manière covalente. Ce procédé
30 est rappelé ci-dessous :



R^1 et R^3 a la même signification que précédemment et R^5 représente le reste d'une protéine, un alkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkyle.

L'haptène de départ (VI) est purifié par chromatographie liquide à haute pression avant d'être couplé au radical NH_2-R^5 . Ce radical R^5 peut être une protéine. Celle-ci est choisie par exemple parmi la sérum-albumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines et notamment la KLH correspondant au terme anglais "keyhole limpet hémocianin", c'est-à-dire une protéine du coquillage connu sous le nom de bernique. On obtient alors un antigène susceptible d'être utilisé dans la fabrication d'anticorps. Lors de la fabrication d'anticorps polyclonaux, la protéine sera choisie de façon à être d'une nature différente de celle de l'animal utilisé pour la production d'anticorps. Les protéines précitées sont bien adaptées lorsque l'on souhaite immuniser un lapin.

Le radical NH_2-R^5 peut être également un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylaminée. On obtient alors un film ou un gel dans lequel l'haptène est lié de manière covalente au support.

On notera que le produit (V) représente un certain nombre des variantes possibles du produit (I).

On donnera ci-après un exemple de réalisation de ce procédé.

5 **Exemple 2 : Synthèse d'un conjugué haptène-protéine (antigène) :**

On dissout 30mg (90 μ moles) de 1-(5-hydroxycytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-hydroxyméthylmorpholine dans 2 ml d'eau. Ce composé dissous
10 dans l'eau est ajouté, en 3 heures, à 5 ml d'une solution contenant 35 mg (180 μ moles) de E.D.C. (N'-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide(chlorhydrate)) et 80 mg de sérumalbumine de bovin. Après avoir laissé
15 reposer cette solution pendant une nuit à température ambiante, l'eau est évaporée sous pression réduite et le résidu obtenu est dissous dans 2 ml d'eau et analysé par chromatographie d'exclusion, (colonne Fractogel TSK-HW40 de Merck, dimensions 20x400 mm, phase mobile NaCl 0,15 M).

20 Le produit élué en premier est collecté, dialysé contre de l'eau et la solution obtenue est alors lyophilisée. On mesure alors la charge du produit en haptène. Cette mesure est obtenue en comparant le spectre d'absorption U.V. de la protéine d'origine à celui de
25 la protéine greffée sur le nucléoside modifié. La comparaison de l'absorption à 270 et 300 nm permet de déterminer que 7,8 moles de 1-(5-hydroxycytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-hydroxyméthylmorpholine sont greffés par mole de protéine.

30

L'invention concerne enfin les anticorps spécifiques des antigènes (V) obtenus par le procédé précédent, dans lequel R⁵ représente le reste d'une protéine.

Les anticorps polyclonaux sont obtenus de façon tout à fait classique par injection à des lapins, comme cela sera détaillé ci-après. Toutefois, l'anticorps obtenu est nouveau puisqu'il est spécifique du nouvel antigène précédemment préparé.

On donnera ci-après un exemple de préparation de ces anticorps polyclonaux.

Exemple 3 : préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques de l'antigène de l'exemple 2

Le protocole d'immunisation a été réalisé à partir de deux lapins femelles de race NZ "S.S.C." de 2 kg qui ont été traités de la façon décrite ci-après.

Une émulsion a été préparée en mélangeant 1 mg par litre du conjugué haptène-protéine précédemment préparé dans l'exemple 2, avec 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Chaque lapin femelle a reçu 10 injections de 100 µl de l'émulsion précitée, dans le cou et sur le dos. Quatre semaines après les premières injections, les lapins ont reçu un premier rappel, pratiqué dans des conditions identiques. Après un nouvel intervalle de 4 semaines, ils reçoivent un nouveau rappel. Celui-ci est pratiqué par injection intramusculaire, au niveau de la hanche, de 0,5 ml d'une émulsion formée de 1 mg/ml de conjugué haptène-protéine et de 1 ml d'adjuvant incomplet de Freund.

Deux semaines plus tard, on prélève 2 à 5 ml de sang au niveau de l'oreille du lapin. Le sérum recueilli permet d'effectuer les premiers tests. Enfin, quatre semaines après le second rappel, un troisième rappel est effectué par injection intramusculaire selon le même principe que celui du deuxième rappel. Deux semaines plus tard, les lapins sont sacrifiés et l'on recueille le maximum de leur sang dont le sérum contient les anticorps spécifiques de l'antigène précité.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus de façon classique en faisant fusionner des cellules de myélome d'un mammifère tel qu'une souris avec des cellules de rate provenant par exemple de la lignée des
5 souris BALB/c, ces souris ayant été immunisées par l'antigène (V) constitué par le morpholino nucléoside modifié lié à la protéine porteuse, (R⁵ représentant une protéine). Ces anticorps sont spécifiques des nouveaux antigènes obtenus par le procédé selon
10 l'invention.

On donnera ci-après un exemple de préparation de ces anticorps monoclonaux.

Exemple 4 : préparation d'anticorps monoclonaux
spécifiques de l'antigène de l'exemple 2 (1-(5-
15 hydroxycytosin-1yl)-4-carboxyméthyl-6-
hydroxyméthylmorpholine)

Immunisation :

Une suspension de l'antigène de l'exemple 2 précité a été émulsionnée dans un volume identique
20 d'adjuvant complet de Freund. Cette émulsion a été injectée par voie intra-péritonéale à des souris femelles de la lignée BALB/c, âgées de 6 à 8 semaines, à raison d'une dose de 0,1 ml d'émulsion. Trois semaines plus tard, une injection de rappel par voie
25 intra-péritonéale est effectuée avec une émulsion de l'antigène de l'exemple 2 et d'adjuvant incomplet de Freund. Deux semaines après cette injection de rappel, l'immunisation finale est réalisée par une injection dans les veines de la queue de la souris, cette
30 injection comprenant l'antigène de l'exemple 2 dissous dans du NaCl 0,15 M

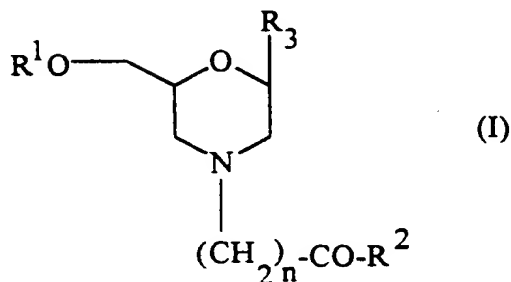
Fusion cellulaire et clonage :

Trois jours après la dernière injection de rappel, les rates ont été prélevées sur les souris et broyées.
35 Les cellules de rate ont été lavées dans du milieu de

Dulbecco modifié ne contenant pas de sérum (DMEM). 10^8 cellules de rates ont été mélangées à 10^7 cellules de myélome puis centrifugées à 500xg pendant 7 minutes à température ambiante. On a éliminé le milieu et
5 récupéré le culot de centrifugation auquel on a ajouté 0,8 ml de PEG 4000 à 50% (Merck), sur une période de 1 minutes avec agitation douce à 37°C. On y a ensuite ajouté du milieu de Dulbecco modifié, à raison de 1 ml pendant 1 minute, puis de 20 ml pendant 5 minutes. Les
10 cellules ont été centrifugées à 200xg pendant 10 minutes puis le culot de centrifugation a été remis en suspension dans 15 ml de DMEM et 10% de FBS (sérum foetal de bovin). Des aliquots de 0,05 ml ont été distribués dans des plaques munies de puits de culture
15 revêtus de macrophages. On a laissé incuber les plaques pendant 24 heures à 37°C avant d'ajouter dans le sputs de l'hypoxanthine (1.10^{-4} M) de l'améthoptérine (4.10^{-7} M) et de la thymidine ($1,6.10^{-5}$ M) dans du DMEM (milieu HAT). Sept jours après la fusion, on a ajouté 0,025 ml
20 de milieu HAT dans chaque puits et on a ensuite renouvelé le milieu tous les 3 à 4 jours. Les colonies ont été testées par la méthode ELISA pour leur activité à l'encontre de l'antigène de l'exemple 2. Seules, les
25 cellules correspondant aux puits positifs ont été clonées.

REVENDICATIONS

1. Dérivés de nucléosides caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule chimique suivante :



5

dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R^2 représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle, un groupe aryle, une protéine comprenant un site aminé libre, un aminoalkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine et R^3 représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

15

2. Dérivés de nucléosides selon la revendication 1, caractérisés en ce que R^3 est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, $-NH-CO-NH-CO-NH_2$, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, $-NH-CHO$, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl, la (5,6-dihydrothymine)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymine)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

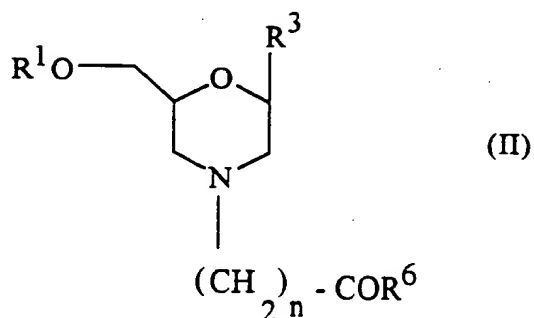
25

3. Dérivés de nucléosides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que R^2 représente une protéine

choisie parmi la sérulalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.

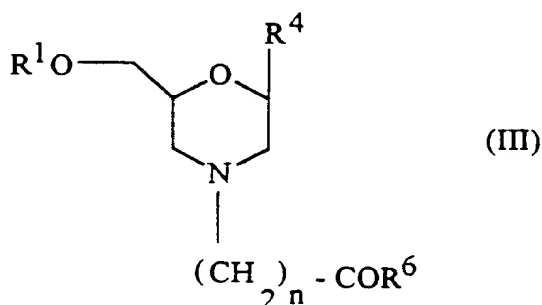
4. Procédé de fabrication des dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :

5



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R^6 représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R^3 représente un base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, consistant à faire réagir un agent substituant avec un dérivé de nucléoside répondant la formule chimique suivante :

15



dans laquelle R^1 et R^6 ont la même signification que précédemment et R^4 représente une base choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

20

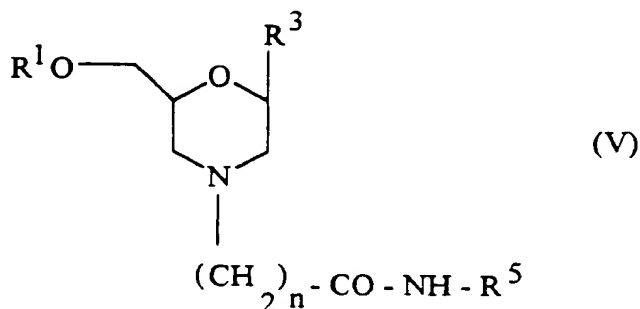
5. Procédé de fabrication selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent substituant est un

agent chimique choisi parmi l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, le brome combiné à la collidine, le brome et Ag_2O , le permanganate de potassium, le tétraoxyde d'osmium, le méthanal ou AlLiH_4 .

5 6. Procédé de fabrication selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent substituant est un traitement choisi parmi la photochimie, les rayonnements ionisants en présence ou en absence d'oxygène, l'hydrogénation catalytique ou le traitement
10 par le brome et l'eau, puis l'hydrogénolyse.

7. Procédé de fabrication selon la revendication 4, caractérisé en ce que R^3 est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, $-\text{NH}-\text{CHO}$, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl, la (5,6-dihydrothymine)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8--oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

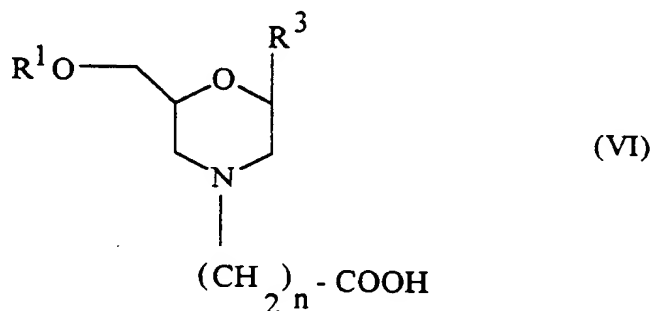
8. Procédé de fabrication d'un dérivé de nucléo-
25 side répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^5 représente le reste d'une protéine, un alkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkyle et R^3 représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine,

5 ce procédé consistant à faire réagir un composé du type NH_2-R^5 , dans lequel R^5 a la même signification que précédemment, avec un dérivé de nucléoside répondant à

10 la formule chimique suivante :



dans laquelle R^1 et R^3 ont la même signification que précédemment.

15

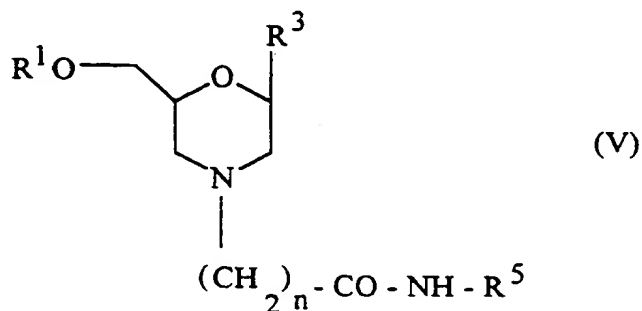
9. Procédé de fabrication selon la revendication 8, caractérisé en ce que R^3 est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, $-NH-CO-NH-CO-NH_2$, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, $-NH-CHO$, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl, la (5,6-dihydrothymine)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymine)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la

20 (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

25

10. Anticorps polyclonaux anti-dérivé de nucléoside, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation d'un mammifère approprié avec l'antigène répondant à la formule chimique suivante :

5

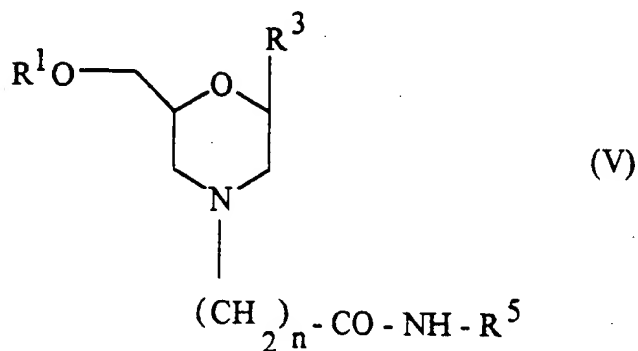


dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^3 représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R^5 représente une protéine ne provenant pas dudit mammifère.

11. Anticorps polyclonaux selon la revendication 10, caractérisés en ce que R^5 représente une protéine choisie parmi la sérumalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.

12. Anticorps polyclonaux selon la revendication 10, caractérisés en ce que R^3 est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, -NH-CO-NH-CO-NH₂, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, -NH-CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl, la (5,6-dihydrothymine)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymine)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

13. Anticorps monoclonaux anti-dérivés de nucléoside, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus en faisant fusionner des cellules de myélome d'un mammifère avec des cellules spléniques de souris immunisées par un antigène répondant à la formule chimique suivante :



- 10 dans laquelle R^1 représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R^3 représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R^5 représente une protéine ne provenant pas de la souris.
- 15 14. Anticorps monoclonaux selon la revendication 13, caractérisés en ce que R^5 représente une protéine choisie parmi la sérumalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.
- 20 15. Anticorps monoclonaux selon la revendication 13, caractérisés en ce que R^3 est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, -NH-CO-NH-CO-NH₂, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, -NH-CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine)-1yl, la (5,6-dihydrothymine)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymine)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanine)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-

hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.

PCT/FR 94/01070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D413/04 C07D473/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 05186 (GILEAD SCIENCES) 2 April 1992 see page 8 - page 13 ---	10
A	WO,A,91 18898 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) 12 December 1991 Abstract see page 39; figure I ---	1
A	US,A,4 515 781 (PAUL F. TORRENCE ET AL.) 7 May 1985 see column 2, line 65 - column 3, line 40 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 1994

Date of mailing of the international search report

13.01.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Kyriakakou, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/01070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 25, 23 December 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 210401c, RAYFORD RICHARD ET AL. 'Reductive alkylation with oxidized nucleotides...' page 478 ;column 2 ; see abstract & J. BIOL. CHEM., vol.260, no.29, 1985 pages 15708 - 15713 cited in the application ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol.52, no.1, July 1964 pages 68 - 74 BERNARD F. ERLANGER ET AL. 'Antibodies specific for Ribonucleosides and Ribonucleotides.....' cited in the application see the whole document ---	1,10
A	CARCINOGENESIS, vol.12, no.5, 1991 pages 865 - 871 PAOLO DEGAN ET AL. cited in the application see the whole document see the whole document ---	10
A	PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY , ACADEMIC PRESS, vol.42, 1992 pages 39 - 77 B. DAVID STOLLAR 'Immunochemical Analyses of Nucleic Acids' cited in the application see the whole document ---	10,14
A	MUTATION RESEARCH, ELSEVIER, vol.233, 1990 pages 219 - 233 CHRISTOPHER P. WILD 'Antibodies to DNA alkylation adducts as analytical tools in chemical carcinogenesis' cited in the application see the whole document -----	10,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

CT/FR 94/01070

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9205186	02-04-92	AU-A- 8646091	15-04-92
		CA-A- 2092002	21-03-92
		EP-A- 0549686	07-07-93
		JP-T- 6505704	30-06-94
WO-A-9118898	12-12-91	NONE	
US-A-4515781	07-05-85	JP-B- 1053880	15-11-89
		JP-C- 1575633	24-08-90
		JP-A- 59205394	20-11-84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

L. nde Internationale No

PCT/FR 94/01070

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE DEMANDE
CIB 6 C07D413/04 C07D473/34

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,92 05186 (GILEAD SCIENCES) 2 Avril 1992 voir page 8 - page 13 ---	10
A	WO,A,91 18898 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) 12 Décembre 1991 Abstract voir page 39; figure 1 ---	1
A	US,A,4 515 781 (PAUL F. TORRENCE ET AL.) 7 Mai 1985 voir colonne 2, ligne 65 - colonne 3, ligne 40 --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 Décembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13. 01. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kyriakakou, G

C.(suite) DOCUMENTS CITÉS EN L'EXAMEN COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, no. 25, 23 Décembre 1985, Columbus, Ohio, US; abstract no. 210401c, RAYFORD RICHARD ET AL. 'Reductive alkylation with oxidized nucleotides...' page 478 ;colonne 2 ; voir abrégé & J. BIOL. CHEM., vol.260, no.29, 1985 pages 15708 - 15713 cité dans la demande ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol.52, no.1, Juillet 1964 pages 68 - 74 BERNARD F. ERLANGER ET AL. 'Antibodies specific for Ribonucleosides and Ribonucleotides.....' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,10
A	CARCINOGENESIS, vol.12, no.5, 1991 pages 865 - 871 PAOLO DEGAN ET AL. cité dans la demande voir le document en entier voir le document en entier ---	10
A	PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY , ACADEMIC PRESS, vol.42, 1992 pages 39 - 77 B. DAVID STOLLAR 'Immunochemical Analyses of Nucleic Acids' cité dans la demande voir le document en entier ---	10,14
A	MUTATION RESEARCH, ELSEVIER, vol.233, 1990 pages 219 - 233 CHRISTOPHER P. WILD 'Antibodies to DNA alkylation adducts as analytical tools in chemical carcinogenesis' cité dans la demande voir le document en entier -----	10,14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

...nde Internationale No

PCT/FR 94/01070

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9205186	02-04-92	AU-A- 8646091 CA-A- 2092002 EP-A- 0549686 JP-T- 6505704	15-04-92 21-03-92 07-07-93 30-06-94
WO-A-9118898	12-12-91	AUCUN	
US-A-4515781	07-05-85	JP-B- 1053880 JP-C- 1575633 JP-A- 59205394	15-11-89 24-08-90 20-11-84